PROGENIE MOLECULAR

CE

RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

GRHI-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler GRHI-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ARN de Influenza A, Influenza B y del gen H1 de la nueva variante de gripe (H1N1) en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- Sensibilidad: 100 copias/µL Influenza A, 100 copias/µL Influenza B y 500 copias/µL Influenza A H1N1.
- Especificidad: Influenza A (gen M1 y M2 (matrix protein)), Influenza B (gen M1 y M2 (matrix protein)) e Influenza A H1N1 (gen hemaglutinina).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* GRHI-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. En la amplificación GRIP, Influenza A se detecta en FAM, Influenza B se detecta en TxR y el control interno en Alx532. En la amplificación de HINI, H1N1 se detecta en FAM y el control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler GRHI-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix GRIP** y **Amplimix HINI**, una **retrotranscriptasa**, un **Control Positivo ARN FluA** y un **Control Positivo ARN FluA H1N1**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
AmpliMix GRIP		1	560 µL	-15 /-25 ºC
AmpliMix HINI		1	540 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ARN FluA		1	60 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ARN FluA H1N1		1	60 µL	-15 /-25ºC
Retrotrans-criptasa		1	16 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ARN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

8 Muestras clínicas

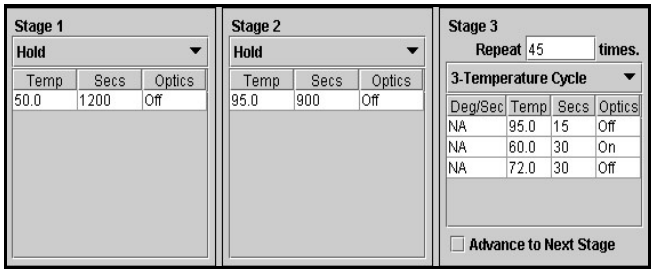
- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ARN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ARN

Procedimiento GRIP

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta FluA.
- TxR: detecta FluB.
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

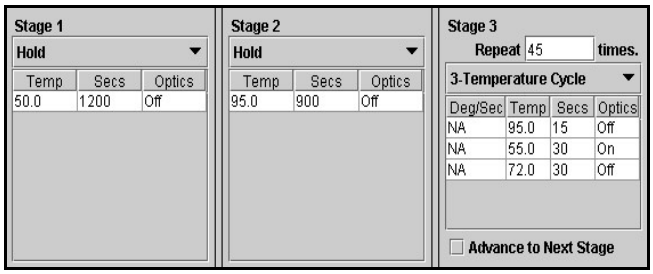
- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo FluA**.
- Tomar una alícuota de **22,8 µL** de Amplimix, añadir **0,3 µL** de **retrotranscriptasa** y **7,5 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “GRIP-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	Indiferente	POSITIVO Influenza A
ND	POS	Indiferente	POSITIVO Influenza B
POS	POS	Indiferente	POSITIVO Influenza A y B
ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	NO VALORABLE

Procedimiento HINI

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta FluA H1N1.
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

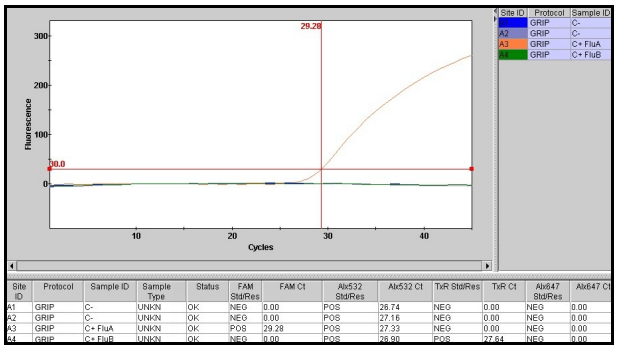
- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo ARN FluA H1N1**.
- Tomar una alícuota de **22 µL** de Amplimix, añadir **0,3 µL** de retrotranscriptasa (tapón azul) y añadir **10 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “HINI-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

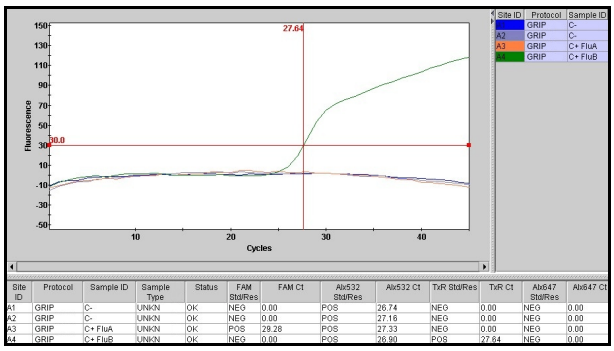
FAM Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	Indiferente	POSITIVO FluA H1N1
ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado

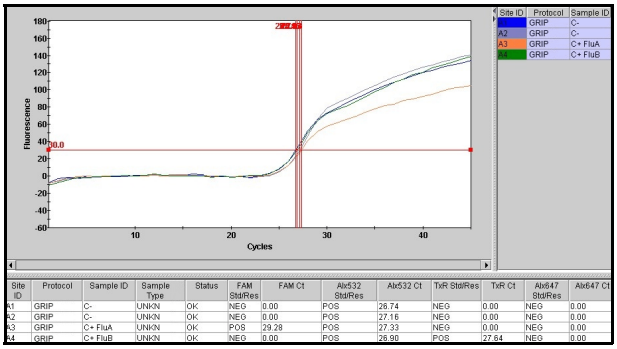
GRIP



Gráfica 1 (Canal FAM: FluA): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal.Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=29,28. Control positivo FluB (A4 en verde): ausencia de señal.



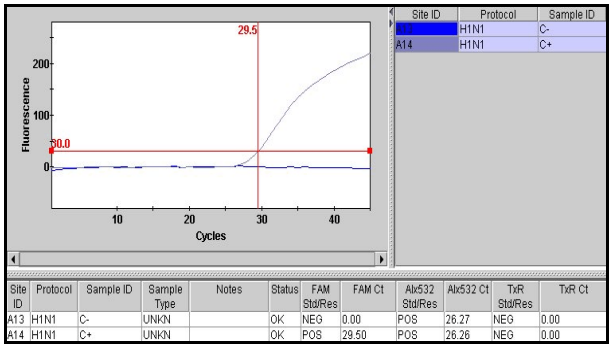
Gráfica 2 (Canal TxR: FluB): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal.Control positivo FluA (A3 en naranja): ausencia de señal. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=27,64.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A1	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.74	NEG	0.00	NEG	0.00
A2	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	27.16	NEG	0.00	NEG	0.00
A3	GRIP	C+ FluA	UNKN	OK	POS	29.28	POS	27.33	NEG	0.00	NEG	0.00
A4	GRIP	C+ FluB	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.90	POS	27.64	NEG	0.00

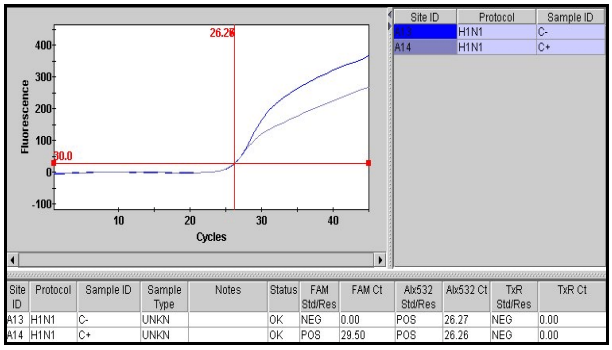
Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): se observa señal con Ct=26,74. Control negativo (A2 en gris): se observa señal con Ct=27,16. Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=27,33. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=26,90.

HINI



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct
A13	H1N1	C-	UNKN		OK	NEG	0.00	POS	26.27	NEG	0.00
A14	H1N1	C+	UNKN		OK	POS	29.50	POS	26.26	NEG	0.00

Gráfica 1 (Canal FAM: FluA H1N1): Resultado obtenido al amplificar un control negativo y un control positivo FluA H1N1. Control negativo (A13 en azul): ausencia de señal. Control positivo FluA H1N1 (A14 en gris): se observa señal con Ct=29,50.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct
A13	H1N1	C-	UNKN		OK	NEG	0.00	POS	26.27	NEG	0.00
A14	H1N1	C+	UNKN		OK	POS	29.50	POS	26.26	NEG	0.00

Gráfica 2 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo y un control positivo FluA H1N1. Control negativo (A13 en azul): se observa señal con Ct=26,27. Control positivo FluA H1N1 (A14 en gris): se observa señal con Ct=26,26.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *RealCycler* GRHI-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Marzo 2012.